

Extraction ARN QIAamp Viral RNA Mini kit – Qiagen

1 OBJECTIF

Ce mode opératoire décrit les conditions opératoires à mettre en œuvre pour réaliser l'extraction d'ARN viral avec le kit QIAamp® Viral RNA Mini (ref.52906) dans le cadre du test Covid-19 dans un laboratoire P3.

2 DOMAINE D'APPLICATION

Ce mode opératoire s'applique aux extractions d'ARN viral pour les tests Covid-19.

3 PERSONNEL CONCERNÉ

Personnel technique du département de BioPathologie.

4 DOCUMENTS ASSOCIÉS ET DÉFINITIONS

- PAM-PROC-0016 : Gestion du travail technique dans le SIL Ariane en Pathologie Moléculaire
- PAM-FQ-0271 : Série extraction ARN QIAamp Viral RNA Mini kit – Qiagen

5 EQUIPEMENT, MATÉRIEL UTILISÉ

5.1 Matériel

Matériel	Fournisseur	Référence	Stockage
Pastilles auto-collantes vertes	Dutscher		P3
Boîte de cônes ART 1000	Dutscher	038029	P3
Boîte de cônes ART 200	Dutscher	038019	P3
Gants latex ou vinyle	Magasin	/	P3
Pipettes P1000/200/	/	/	P3
Tubes à vis 1.5ml	SARSTEDT	72692005	P3
Tubes à vis 2ml	SARSTEDT	72693005	P3
Tubes 50 ml	DUTSCHER	227261	P3
Tubes 15 ml	DUTSCHER	352096	P3
Boite en carton ARN	DUTSCHER	039542	P3 et stock
Scotch	Magasin	/	P3
Logiciel SIL	/	/	/

5.2 Equipement

Equipement	Localisation
PSM	P3
Vortex	P3

Centrifugeuse	P3
Bac à glace	P3

5.3 Réactifs

Réactif	Fournisseur	Référence	Mode d'emploi	Stockage
QIAamp® Viral RNA Mini kit (250 extractions)	Qiagen	52906	- tampon AVL (lyse) : prêt à l'emploi - tampons AW1 et AW2 (lavages) : à reconditionner avec de l'éthanol absolu - tampon AVE (élution) : prêt à l'emploi - carrier RNA : lyophilisé, à réhydrater avec 310µl de tampon AVE	P3 Température ambiante
Ethanol Absolu (1L)	ADL ET PROCHILAB	3086072	Prêt à l'emploi	P3 – Temp. ambiante (Réserve BioPath)

6 DESCRIPTION DES ACTIVITÉS

Toute la procédure doit être réalisée au P3 sous PSM2.

Les prélèvements peuvent être conservés à +4°C pendant 72 heures avant extraction.

6.1 Préparation des réactifs

- Tampon de lyse AVL : prêt à l'emploi, vérifier l'absence de précipité dans le tampon. En cas de précipité, chauffer le tampon à 80°C
- **Tampon AW1 (98ml) : ajouter 130ml d'éthanol absolu**, mélanger (stable 1 an à 15-25°C)
- **Tampon AW2 (66ml) : ajouter 160ml d'éthanol absolu**, mélanger (stable 1 an à 15-25°C)
- Tampon AVE : prêt à l'emploi
- **Carrier RNA (lyophilisé) : ajouter 310µl de tampon AVE** (concentration finale = 1µg/µl). Mélanger doucement puis aliquoter et congeler à -20°C. Attention : ne pas décongeler plus de 3 fois
- Ethanol 100 % aliquoté en tubes 50 ml à -20 °C (congélo freezer 2 tiroir 3)

6.2 Avant extraction

6.2.1 Préparation du mélange tampon AVL + Carrier RNA

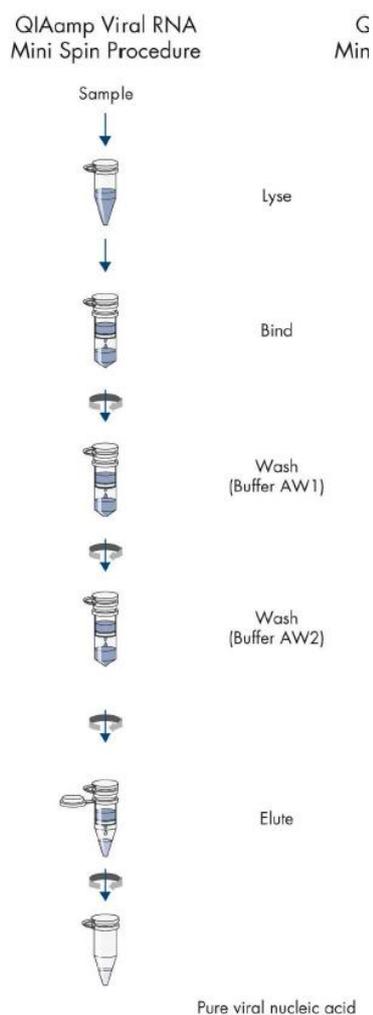
Préparer extemporanément le mélange AVL+ carrier en fonction du nombre d'échantillons à extraire (+1 volume mort) :

No. samples	Buffer AVL (ml)	Carrier RNA-AVE (µl)	No. samples	Buffer AVL (ml)	Carrier RNA-AVE (µl)
1	0.56	5.6	13	7.28	72.8
2	1.12	11.2	14	7.84	78.4
3	1.68	16.8	15	8.4	84.0
4	2.24	22.4	16	8.96	89.6
5	2.80	28.0	17	9.52	95.2
6	3.36	33.6	18	10.08	100.8
7	3.92	39.2	19	10.64	106.4
8	4.48	44.8	20	11.20	112.0
9	5.04	50.4	21	11.76	117.6
10	5.60	56.0	22	12.32	123.2
11	6.16	61.6	23	12.88	128.8
12	6.72	67.2	24	13.44	134.4

6.2.2 Constitution des séries de travail

- **Capacité maximale d'une série = 11 cas + 1 blanc d'extraction**
- Intégrer le témoin « blanc » à des positions aléatoires
- Attribuer à chaque tube contenant les prélèvements un numéro de 1 à 12
- Entourer les tubes de scotch pour éviter l'effacement du marqueur
- Générer la série dans Ariane, l'exporter puis la copier dans le formulaire de série d'extraction PAM-FQ-0271 (en format excel sur l'ordinateur du P3, pas d'impression papier)
- Préparer les tubes de stockage finaux des ARN pré-identifiés (n° SIL)

6.3 Extraction ARN



(January 2020 QIAamp® Viral RNA Mini Handbook For purification of viral RNA from plasma, serum, cell-free body fluids and culture supernatants)

Allumer l'autoclave

L'intégralité de l'extraction s'effectue sous la PSM2.

- Ouverture du PSM :

Avec la télécommande ouvrir la vitre de la hotte en maintenant le bouton du haut jusqu'à ce qu'elle se bloque, toujours avec la télécommande mettre le PSM sous tension et allumer la lumière.

- Nettoyer le plan de travail avec l'alcool 70% (solution jaune) et essuyer avec du sopalin

Mettre le matériel sous le PSM (pipettes, cônes p1250, cônes p300, portoir, vortex)

- Par échantillon préparer deux tubes : le tube stock (en double pour prélèvement homogénéisé et centrifugé) (tube avec un bouchon à vis 2 ml avec l'étiquette ariane) et le tube 1 (en double pour extraction 1 et 2) pour le mélange tampon lyse + échantillon numéroté (identifié)
- Sous PSM ajouter les 560µl de tampon AVL dans chaque tube 1
- Récupérer les prélèvements naso-pharyngés dans le sas matériel on les pose directement sous la hotte, on enlève le premier emballage, on récupère la feuille de prescription (en vérifiant concordance identité patient entre prescription et prélèvement), et on la pose à l'extérieur de la hotte. On recommence pour chaque prélèvement. Une fois toutes les ordonnances récupérées, on passe à l'enregistrement sous ariane.
- Changer de gants lorsqu'on sort du PSM
- **Enregistrement demande sous Ariane à compléter :**
 - **Demande** : prescripteur = ISO ou Médecin prescripteur identifié sur la feuille de demande ; Type d'activité = COVID-19, exécutant = PM
 - **Prélèvement** : nature = ENP (Ecouvillon Naso Pharyngé), organe et contenant automatiques (M4RT, fosses nasales)
 - **Programmation analyse** : ajouter l'indication COVID-19 = ajout automatique de l'extraction ARN viral + RT-PCR Covid-19

➤ Préparation des prélèvements :

Les écouvillons naso-pharyngé sont transportés dans un milieu de conservation (3ml).

Homogénéiser le prélèvement avec l'écouvillon

***Pendant la phase de validation du kit d'extraction,**

- **prélever un aliquot de 1ml pour envoi au CHU dans un Falcon de 15 ml**
- **prélever un aliquot de 1ml pour extraction 1 à partir du prélèvement total homogénéisé et** le transférer dans le tube stock étiqueté « non centrifugé ».
Prélever 140µl du liquide du tube de 2ml identifié « non centrifugé » et les transférer dans un nouveau tube 1.5ml à vis identifié > **extraction 1 (prélèvement total non centrifugé)** contenant 560µl de tampon AVL
- **Utiliser le reste du tube avec écouvillon pour extraction 2 à partir du surnageant obtenu après centrifugation** 10min à 1500g dans la centrifugeuse à nacelles. Les tubes (avec écouvillon) doivent être disposés dans la nacelle sous le PSM. Les nacelles seront fermées hermétiquement avec leur couvercle avant de lancer la centrifugation. Les tubes une fois centrifugés sont sortis de la nacelle sous le PSM2.

Transférer la totalité du surnageant dans un nouveau tube identifié « centrifugé ou surnageant »

Fermer le Falcon avec l'écouvillon et le jeter dans la DASRI

- Prélever 140µl du surnageant et les transférer dans un nouveau tube 1.5ml à vis identifié > **extraction 2 (surnageant)** contenant 560µl de tampon AVL

Le tube Falcon pour le CHU sera désinfecté à l'éthanol puis mis dans un double emballage au P3 puis mis dans un triple emballage avec un double de la feuille de prescription dans le SAS, et remonté à la biologie qui s'occupera de l'envoi au CHU (nouvel enregistrement et bon de commande pour le CHU). La navette part à 14h30.

***Après la phase de validation du kit** un choix sera fait entre **extraction 1 (prélèvement total non centrifugé)** et **extraction 2 (surnageant)**

Conserver les restes de prélèvements à -150°C après extraction

➤ **Extraction ARN :**

- 1- Mettre les tubes stock dans la boîte de transport qui sera par la suite rangée au -20°C (congelé freezer 2 tiroir 3) et après la manip on transfère les tubes à -150°C (au P3) rack 11 (les six premières boîtes)
- 2- Vortexer 15sec les tubes contenant l'échantillon et le tampon AVL
- 3- Jeter la deuxième paire de gants, puis mettre une nouvelle deuxième paire de gants et lancer le chrono pendant 10 min
- 4- Incuber 10min à température ambiante -> virus inactivé (Préparer les 5 tubes collecteur, la colonne et le tube ARN étiqueté) (Lyse)
- 5- Centrifuger brièvement les tubes
- 6- Ajouter 560µl d'éthanol absolu
- 7- Vortexer puis centrifuger brièvement

Volume total = 1260µl ; à déposer en 2 fois sur les colonnes

- 8- Prélever 630µl et les déposer dans la colonne sans toucher la membrane
- 9- Centrifuger 1min à 6000g. Eliminer le filtrat et placer la colonne sur un nouveau tube collecteur (Bind)
- 10- Répéter les étapes 8 et 9

NB : fermer les colonnes à chaque étape pour éviter les contaminations croisées

- 11- Ajouter 500µl de tampon AW1 sur les colonnes. Centrifuger 1min à 6000g (Wash)
- 12- Eliminer le filtrat et placer la colonne sur un nouveau tube collecteur
- 13- Ajouter 500µl de tampon AW2 sur les colonnes. Centrifuger 3min à vitesse max (16100g) (Wash)
- 14- Eliminer le filtrat et placer la colonne sur un nouveau tube collecteur
- 15- Centrifuger 1min à vitesse max (16100g) pour éliminer toute trace de tampon AW2
- 16- Jeter le tube collecteur et placer la colonne sur un tube RNase free 1.5ml identifié (1 étiquette)
- 17- Ajouter 140µl de tampon AVE (à température ambiante) au centre de la colonne, sans toucher la membrane

- 18- Incuber 1min à température ambiante
- 19- Centrifuger 1min à 6000g (Elute)
- 20- Mettre sur le 3^{ème} portoir les tubes d'ARN préalablement lavés avec un sopalin imbibé d'éthanol 70 (jaune)
- 21- Placer les tubes ARN (décontaminé à l'alcool) extraits sur la glace dans le sas matériel

Les stocker à - 80°C après utilisation. Les ARN extraits sont stables 1 an à -20°C.

➤ **Nettoyage du poste de travail – décontamination du matériel :**

- Décontamination du matériel sous la hotte : asperger le matériel avec de l'éthanol 70 % (jaune) et essuyer avec du sopalin, sortir le matériel et le ranger dans les tiroirs.
- Fermer la DASRI et la mettre dans la poubelle à déchets solides
- Stocker les poubelles fermées dans l'autoclave et les ouvrir tous les vendredis après la dernière manipulation
- Décontaminer le plan de travail et la vitre (côté intérieur du PSM) à l'éthanol 70 (jaune) et essuyer au sopalin

NB : changer la deuxième paire de gants

- Fermeture du PSM : avec la télécommande appuyer sur la flèche du bas jusqu'à la fermeture complète et éteindre l'électricité et la lumière
- Le virkon (solution rose) est utilisé lorsque l'on fait accidentellement des souillures au niveau des paillasse et de la hotte
- Eteindre l'autoclave
- Récupérer le bac à glace avec les ARN dans le sas matériel

6.4 Après extraction

- Assurer la traçabilité de la série technique selon la procédure PAM-PROC-0016 – Gestion du travail technique dans le SIL Ariane en Pathologie Moléculaire (Nature d'ARN = ARN viral, contenant = QIAamp Viral RNA Mini)
- Stocker les prélèvements dans Ariane pour attribuer les positions de stockage (équipement = COVID-19)
- Préparer les pastilles vertes des positions de stockage (n° boîte de stockage/position du tube dans la boîte)
- Imprimer les étiquettes de prélèvement. Coller l'étiquette sur chaque tube et la pastille verte de position sur le bouchon du tube
- Imprimer la feuille de série d'extraction remplie PAM-FQ-0271, y coller l'étiquette de série Ariane et la ranger dans le lutin de suivi des extractions

7 TRACABILITÉ

- Assurer la traçabilité des lots de réactifs sur le PAM-FQ-0014 (formulaires spécifiques à chaque réactif disponibles dans le classeur dédié au laboratoire général) : remplir le formulaire à chaque réception de nouveau réactif et à chaque changement de lot de réactif.
- Ranger les feuilles de séries dans le lutin des extractions situé dans le bureau des techniciens.
- Tracer le résultat du blanc d'extraction sur PAM-FQ-0054 - Suivi des blancs d'extraction